

Interplay between tumor angiogenesis and the immune system : towards a new cancer therapy.

Citation for published version (APA):

Dirkx, A. E. (2006). *Interplay between tumor angiogenesis and the immune system : towards a new cancer therapy*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060323ad>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060323ad](https://doi.org/10.26481/dis.20060323ad)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 05 May. 2023

SUMMARY

This thesis describes the interplay between tumor angiogenesis and the immune system, with special emphasis on leukocyte-vessel wall interactions inside the tumor. In Europe and America, cancer is one of the most important causes of death. For the development of novel treatment strategies for cancer, it is necessary to fundamentally understand the process of tumor initiation, progression and metastasis. Angiogenesis is an important part of the last two. Besides allowing the tumor to grow and providing a route for metastasis, the presence of blood vessels in a tumor also enables various immune cells to enter the tumor and perform their particular immune function. As a result, the tumor can be infiltrated by leukocytes, a phenomenon observed in most solid cancers. Although frequently associated with better prognosis, these immune responses are often weak and not able to completely destroy a tumor, suggesting that tumors have developed mechanisms to escape immune surveillance. The aim of the present study was to investigate the relationship between angiogenesis and immunity in tumors and to explore ways of modulating this relationship in order to improve the prognosis of patients enhancing the activity of novel anti-cancer therapies.

Chapter 1 provides background information on several topics described in this thesis. First, an overview is given of both the angiogenic cascade and the process of leukocyte-vessel wall interactions. Subsequently, present knowledge on the influence of tumor angiogenesis on leukocyte-vessel wall interactions is discussed. Although angiogenesis enhances the possibilities for leukocytes to interact with the vessel wall inside a tumor, it has been shown before that exposure of endothelial cells to angiogenic factors (produced by tumor cells, such as VEGF and bFGF) downregulates adhesion molecule expression and, hence, leukocyte-vessel wall interactions *in vitro* and also *in vivo*. Moreover, an angiogenic environment hampers the upregulation of adhesion molecule expression by proinflammatory cytokines, a phenomenon called endothelial cell anergy. These tumor-regulated mechanisms are thought to help the tumor to escape immune surveillance. Finally, this chapter provides an introduction to the contents of the thesis.

For the studies presented in **chapters 2 and 3**, we have developed a new mouse model in which angiogenesis and leukocyte-vessel wall interactions can be quantified non-invasively both in and outside a tumor, allowing longitudinal analysis during tumor development and/or in the course of anticancer treatment. A small tumor was grown in the ear, and intravital microscopy was used to quantify *in vivo* the effects of the tumor on leukocyte-vessel wall interactions and on fluid dynamic conditions in microvessels in and outside the tumor. In the study described in **chapter 2**, we demonstrated in both a syngeneic mouse model (C57Bl/6 mice bearing murine B16F10 melanomas) and an allogeneic mouse model (nude mice bearing small human LS174T colon carcinomas) that leukocyte-vessel wall interactions are suppressed in microvessels within a small tumor, but not in healthy vessels outside the tumor. The reduction in leukocyte-vessel wall interactions in tumor vessels appeared to be caused by a decreased expression of adhesion molecules on endothelial cells, and not by suppression of adhesion molecules on leukocytes. FACS-analysis showed that isolated tumor endothelial cells have suppressed levels of ICAM-1 as compared to endothelial cells from normal mouse tissues. The study described in this chapter was the first to show a systemic effect of a large tumor: leukocyte-vessel wall interactions appeared to be downregulated in ear microvessels of mice bearing a large tumor on their flank. This systemic effect was less pronounced as compared to the situation within a tumor; leukocyte adhesion was only partially down regulated, while inside a tumor the level of adhesion was reduced to undetectable levels. Summarizing, the results described in this chapter show that tumors have evolved mechanisms to escape from immune surveillance.

In **chapter 3** we hypothesized that inhibition of angiogenesis would overcome this tumor escape from immunity. This was investigated both *in vivo* and *ex vivo* in our mouse models, applying

intravital microscopy, immunohistochemistry and qRT-PCR, and *in vitro* on cultured endothelial cells by means of FACS-analysis and qRT-PCR. The angiogenesis inhibitors anginex, endostatin and angiostatin, and also the chemotherapeutic agent paclitaxel were found to significantly stimulate leukocyte-vessel wall interactions by circumvention of endothelial cell anergy *in vivo*, i.e. by upregulation of endothelial adhesion molecules in tumor vessels. This was confirmed by *in vitro* studies on cultured endothelial cells at the protein and mRNA levels. The new angiostatic designer peptide anginex was most potent at overcoming endothelial cell anergy. The enhanced leukocyte-vessel interactions led to an increase in the numbers of tumor infiltrating leukocytes. While anginex inhibited tumor growth and microvessel density (MVD) significantly, the amount of infiltrating leukocytes (CD45), as well as the number of infiltrated CD8+ cytotoxic T-lymphocytes, was enhanced markedly. The results described in this chapter indicate that not all angiogenesis inhibitors tested showed the same inflammatory response. The angiogenesis inhibitor TNP-470 was not able to increase leukocyte-vessel wall interactions in tumor vessels. Treatment of mice with the chemotherapeutic agent cyclophosphamide did induce an increase in leukocyte-vessel wall interactions in tumor vessels, but this effect did not reach the level of significance. The results presented in this chapter suggest that immunotherapy strategies can be improved by combination with anti-angiogenic and chemotherapeutic agents.

In AIDS-associated Kaposi's sarcoma lesions, an angio-proliferative tumor, the level of leukocyte-vessel wall interactions appears to be high with prominent infiltration of monocytes and T-cells. This is in contrast to the situation in other tumors, where immune surveillance is low (see above). In the study described in **chapter 4**, we show that the HIV-1 Tat protein (a regulatory protein of HIV-1 released by infected cells) and TNF α (a cytokine increased in sera and tissues of HIV-1-infected patients) synergistically stimulate the adhesion of leukocytes to endothelial cells *in vitro* as well as *in vivo*. This effect is selectively mediated by HIV-1 Tat, since HIV-1 Nef, another HIV-1 regulatory protein, and the HIV-1 envelope protein gp41, had no effect. *In vitro* adhesion assays with peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and quantitative cell type analysis of adherent cells by FACS demonstrated that HIV-1 Tat selectively activates the adhesion of T-cells and monocytes, but not of B-cells. Intravital microscopic studies in mice confirmed the synergistic activity of HIV-1 Tat and TNF α on leukocyte adhesion to the endothelium *in vivo*. These data indicate that HIV-1 Tat in combination with TNF α may contribute to the vascular damage and cardiovascular diseases observed in AIDS patients, and also to the prominent extravasation of T-cells and monocytes which is a key process in the formation and progression of Kaposi's sarcoma lesions.

The role of a tumor immune infiltrate in cancer progression and metastasis has frequently been debated. Although often considered to be associated with improved prognosis and leading to enhanced survival of cancer patients, inflammatory cells have also been described to assist the capability of the tumor to progress, proliferate and metastasize. Tumor associated macrophages (TAMs), for example, have been shown to be symbiotically related to tumor cells. Tumor cells recruit TAMs and provide them with survival factors, while TAMs in turn produce a variety of angiogenic factors in response to the tumor microenvironment. **Chapter 5** reviews the research on the composition of immune infiltrates in tumors, and on the angiogenic and angiostatic properties of the infiltrated immune cells. Special emphasis is on the angiogenesis-associated activities of TAMs. Although little is known on the angiostatic properties of TAMs, they are reported to produce several angiostatic compounds, such as IL-12, IL-18 and matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). In contrast, more research has focused on their angiogenic properties [a.o. production of IL-1, VEGF, IL-8, bFGF, TNF α and MMP-9], which will hopefully raise new opportunities to counteract these activities in order to treat cancer. The development of immune and gene therapies using TAMs to mediate tumor

cytotoxicity or to deliver gene constructs is also discussed. The ability of macrophages to infiltrate tumors can be used to develop immunotherapeutic approaches for cancer treatment. Since immunotherapy has so far not been as effective as anticipated, a combination therapy in which angiostatic agents are used as well is put forward as a novel strategy to treat cancer.

In conclusion, inhibition of angiogenesis is a promising approach for treatment of cancer and various other diseases like diabetes, rheumatoid arthritis, and cardiovascular diseases. Angiostatic factors not only inhibit tumor vessel formation, inducing tumor starvation, but they also modulate leukocyte-vessel wall interactions, making the tumor more vulnerable to immune attack. A combination of angiostatic treatment with conventional immunotherapy strategies represents a promising way to improve cancer therapy.

SAMENVATTING

In dit proefschrift wordt de wisselwerking tussen tumor angiogenese en het immuunsysteem beschreven. De nadruk ligt hierbij op de interacties die leukocyten (witte bloedcellen) aangaan met de bloedvat wand. In de westerse wereld is kanker één van de voornaamste doodsoorzaken. Daarom is het belangrijk om de verschillende processen die betrokken zijn bij het ontstaan van een tumor zo goed mogelijk te begrijpen, en deze kennis te gebruiken voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën tegen deze ziekte. De vorming van nieuwe bloedvaten die een tumor van bloed gaan voorzien (angiogenese) is noodzakelijk voor de groei van de tumor en maakt tevens metastasering van de tumor mogelijk. Daartegenover staat dat de aanwezigheid van bloedvaten in een tumor er ook toe leidt dat cellen uit het immuunsysteem in de tumor kunnen doordringen. Veel tumoren zijn dan ook geïnfiltrerd met leukocyten. Echter, de immuunrespons van deze leukocyten tegen de tumor blijkt vaak erg zwak te zijn en niet in staat om de tumor te vernietigen. Dit suggereert dat tumoren mechanismen hebben ontwikkeld om te ontsnappen aan het immuunsysteem. Het doel van de studies die in dit proefschrift zijn beschreven was dan ook om de relatie te onderzoeken die bestaat tussen tumor angiogenese en de werking van het immuunsysteem in tumoren, om via deze weg bij te dragen aan de ontwikkeling van een nieuwe behandelmethodede tegen kanker.

Het **eerste hoofdstuk** verschaft achtergrondinformatie omtrent de verschillende onderwerpen die in dit proefschrift aan bod komen. Allereerst wordt er een overzicht gegeven van de angiogenese cascade en het proces van leukocyt-vaatwand interacties. Hoewel tumor angiogenese in principe de mogelijkheid voor leukocyten om een interactie aan te gaan met de vaatwand binnen de tumor vergroot, is ook bekend dat de blootstelling van endotheelcellen aan angiogene factoren (geproduceerd door tumorcellen, zoals VEGF en bFGF) de expressie van adhesiemoleculen op het endotheel verlaagt en daarmee zowel *in vitro* als *in vivo* leidt tot een daling in leukocyt-vaatwand interacties. Bovendien blijkt de opregulatie van endotheliale adhesiemoleculen door pro-inflammatoire cytokinen geremd te worden in een angiogeen milieu (ook wel endotheelcel anergie genoemd). Bovenstaande mechanismen spelen waarschijnlijk een rol bij het ontsnappen van een tumor aan het immuunsysteem. Het eerste hoofdstuk wordt afgesloten met een overzicht van de inhoud van het proefschrift.

Voor de experimenten die beschreven staan in **hoofdstukken 2 en 3** hebben we een nieuw muismodel ontwikkeld, waarin angiogenese en leukocyt-vaatwand interacties op een niet-invasieve wijze bestudeerd kunnen worden, zowel binnen als buiten een tumor. Met behulp van intravitaal microscopie zijn leukocyt-vaatwand interacties *in vivo* in venulen in de huid van een muizenoor bestudeerd, zowel in nieuw-gevormde vaten in de tumor als in gezonde vaten buiten de tumor. In het tweede hoofdstuk worden experimenten beschreven die zijn uitgevoerd in een syngene muus model (C57Bl/6 muizen met een B16F10 melanoom) en in een allogene muismodel (Swiss/nude muizen met een humaan LS174T colon carcinoom). De bevindingen tonen aan dat het niveau van leukocyt-vaatwand interacties in tumorvaten significant lager is dan in gezonde vaten buiten de tumor. De verminderde leukocyt-vaatwand interacties in tumor vaten bleken veroorzaakt te worden door een verlaagde expressie van adhesiemoleculen op de endotheelcellen, en niet op de leukocyten zelf. Analyse met behulp van FACS liet namelijk zien dat de ICAM-1 expressie op tumor endotheelcellen lager is dan op endotheelcellen verkregen uit gezond muizenweefsel. Daarnaast werd in deze studie voor de eerste keer aangetoond dat een grote tumor een systemisch effect heeft; in muizen met een grote tumor op de flank was het aantal leukocyt-vaatwand interacties in bloedvaten in de oorhuid lager dan in gezonde muizen. Dit systemisch effect was wel minder uitgesproken dan de situatie in de tumor zelf; de adhesie van leukocyten aan de vaatwand was slechts gedeeltelijk verlaagd, terwijl in tumor vaten het niveau van leukocyten adhesie bijna tot het

nulpunt gedaald was. We concluderen uit deze resultaten dat tumoren mechanismen hebben ontwikkeld om te ontsnappen aan het immuunsysteem.

Indien de tumor angiogenese mede verantwoordelijk is voor het feit dat tumoren het immuunsysteem ontwijken, dan kan remming van die angiogenese er wellicht voor zorgen dat tumoren weer detecteerbaar worden voor het immuunsysteem. Dit is dan ook de hypothese waarmee we tijdens de experimenten die beschreven staan in **hoofdstuk 3** hebben gewerkt. Zowel *in vivo* als *ex vivo* (intravitaal microscopie, immunohistochemie en qRT-PCR) en *in vitro* (FACS analyses en qRT-PCR) is gekeken naar de effecten van angiogenese remming op leukocyt-vaatwand interacties en de expressie van adhesiemoleculen in tumor bloedvaten. De angiogeneseremmers anginex, endostatine en angiostatine, maar ook het chemotherapeuticum paclitaxel stimuleerden op significante wijze de leukocyt-vaatwand interacties in tumor vaten door middel van opregulatie van de adhesiemolecuul expressie op endotheelcellen. Dit werd bevestigd door *in vitro* experimenten met gekweekte endotheelcellen, zowel op eiwit als mRNA niveau. De nieuwe angiogeneseremmer anginex was het beste in staat de endotheelcel anergie op te heffen, wat resulteerde in een toegenomen infiltratie van leukocyten (CD45) en CD8+ cytotoxische T-cellen in behandelde tumoren. De resultaten laten ook zien, dat niet iedere angiogeneseremmer in staat is leukocyt-vaatwand interacties in tumoren te doen toenemen (zoals geldt voor TNP-470). Ook het chemotherapeuticum cyclophosphamide slaagde er niet in de leukocyt-vaatwand interacties in tumoren significant te verhogen. De resultaten beschreven in dit hoofdstuk laten echter wel zien dat immuuntherapie tegen kanker wellicht verbeterd kan worden door te combineren met remming van angiogenese.

In Kaposi's Sarcoma, een vorm van kanker die vaak wordt gezien in AIDS-patiënten, is het niveau van leukocyt-vaatwand interacties hoog en wordt veelal een grote infiltratie gezien van monocysten en T-cellen, dit in tegenstelling tot de situatie in veel andere tumoren. In de experimenten beschreven in het **vierde hoofdstuk** laten we zien dat het HIV-1 Tat proteïne (een regulator eiwit van HIV-1, afgegeven door geïnfecteerde cellen) en TNF α (een inflammatoir cytokine dat verhoogd is in het serum en in de weefsels van HIV-1 geïnfecteerde individuen) op synergistische wijze de adhesie van leukocyten aan het endotheel stimuleren, zowel *in vitro* als *in vivo*. Dit effect kan toegeschreven worden aan HIV-1 Tat, aangezien twee andere eiwitten, HIV-1 Nef en HIV-1 gp41, geen effect op leukocyt-vaatwand interacties bleken te hebben. Met behulp van *in vitro* adhesie experimenten met mononucleaire perifere bloedcellen gevolgd door een FACS analyse, is aangetoond dat HIV-1 Tat bovendien selectief de adhesie van T-cellen en monocysten stimuleert, maar niet van B-cellen. Intravitaal microscopie bevestigde de synergistische activiteit van HIV-1 Tat en TNF α op leukocyt-vaatwand interacties *in vivo*. Deze data laten zien dat HIV-1 Tat in combinatie met TNF α een bijdrage zou kunnen leveren aan de cardiovasculaire ziekten die vaak optreden in AIDS-patiënten, en daarnaast ook aan de extravasatie van T-cellen en monocysten die een belangrijke rol speelt bij het ontstaan en de progressie van lesies behorend bij Kaposi's Sarcoma.

De rol van een immuuninfiltraat tijdens de progressie en metastasering van kanker wordt tot op de dag van vandaag betwist. Vaak wordt de aanwezigheid van zo'n infiltraat geassocieerd met een verbeterde prognose en een verhoogde overlevingskans voor kanker patiënten. Echter immuuncellen worden ook wel beschreven als cellen die de tumor assisteren met betrekking tot proliferatie en metastasering. Tumor geassocieerde macrofagen (TAMs) zijn bijvoorbeeld op symbiotische wijze verbonden met tumorcellen; tumorcellen rekruteren TAMs en zorgen voor hun overleving, terwijl TAMs op hun beurt diverse angiogene factoren produceren die de tumor helpen zich verder te ontwikkelen. **Hoofdstuk 5** is een review van de huidige stand van zaken in het onderzoek naar de samenstelling van een immuuninfiltraat in tumoren en naar de angiogene en

anti-angiogene eigenschappen van geïnfilteerde immuuncellen. Speciale aandacht wordt besteed aan de met angiogenese geassocieerde activiteiten van TAMs. Er is weinig bekend over de anti-angiogene eigenschappen van TAMs, maar we weten wel dat ze verschillende anti-angiogene factoren produceren, zoals IL-12, IL-18 en matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). Er is meer bekend over de angiogene eigenschappen van TAMs (zoals de productie van IL-1, VEGF, IL-8, bFGF, TNF α en MMP-9). Dergelijke kennis zou bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van nieuwe mogelijkheden om deze eigenschappen tegen te gaan en zo te komen tot een nieuwe methode om kanker te behandelen. De ontwikkeling van immuun- en gentherapieën waarbij gebruik wordt gemaakt van TAMs wordt ook in dit hoofdstuk beschreven. Het feit dat macrofagen in staat zijn tumoren te infiltreren zou gebruikt kunnen worden om nieuwe immuuntherapeutische benaderingen te ontwikkelen voor de behandeling van kanker. Echter, immuuntherapie is tot op heden niet zo effectief gebleken als tevoren gedacht; wellicht zou een gelijktijdige behandeling met angiogese remmers hier een oplossing kunnen bieden.

De remming van angiogenese is een veelbelovende manier om kanker te behandelen, maar zou ook toepasbaar kunnen zijn voor andere ziekten zoals diabetes, reumatoïde artritis en hart- en vaatziekten. In een tumor remmen anti-angiogene factoren niet alleen de vorming van nieuwe bloedvaten (om zodoende de tumor uit te hongeren), maar ze maken de tumor ook meer toegankelijk voor het immuunsysteem, aangezien ze een stimulerend effect hebben op leukocyt-vaatwand interacties. De combinatie van angiogeneseremmers en conventionele immuuntherapie is een veelbelovende manier om de effectiviteit van de behandeling van kanker te verhogen.